

明細書

グルコース脱水素酵素とシトクロームとの融合蛋白質

技術分野

- 5 本発明はグルコース脱水素酵素とシトクロームとの融合蛋白質、およびこれを用いるグルコースのアッセイに関する。

背景技術

- 10 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。ピロロキノリンキノン
- 15 を補酵素とするグルコース脱水素酵素（PQQGDH）はグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。

- 20 PQQGDHをその表面に固定化した酵素電極を用いてグルコースをアッセイするためには、PQQGDHの酸化還元中心であるPQQから電極に電子を伝達させるために、測定系に電子メディエータを加える必要がある。このため、電子メディエータの安定性や溶解性により電極の特性が制限されたり、夾雑物と電子
- 25 メディエータとの反応により測定バックグラウンドが高くなるという欠点がある。さらに電子メディエータはインピボでの使用に適していないため、体内埋込型のグルコースセンサーにおけるPQQGDHの適用が制限されていた。この問題を解決するために、PQQGDHを電子伝達蛋白質とともに電極上に固定化する方法が提案されている（WO 02/073181）。しかし、この方法においては
- 25 大過剰モルの電子伝達蛋白質を用いる必要があるため、コストが高いという難点があった。したがって、当該技術分野においては、電子メディエータを必要としない“直接電子伝達型”のグルコースセンサー用の素子が求められている。

本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある：J. Okuda, J. Wakai, N. Yuhashi, K. Sode, Biosensors & Bioelectronics 18 (2003) 699-704 ; J.

Okuda, J. Wakai, K. Sode, Anal. Lett. 35 (2002) 1465-1478

発明の開示

5 本発明は、電子メディエータを必要としない直接電子伝達型のグルコースセンサーの製造を可能とする改変型PQQGDHを提供することを目的とする。

本発明は、ピロロキノリンキノングルコース脱水素酵素（PQQGDH）とシトクロームとの融合蛋白質を提供する。好ましくは、PQQGDHは、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来の水溶性PQQGDHである。

10 本発明の融合蛋白質においては、シトクロームは、好ましくはPQQGDHのC末端側に融合されている。また好ましくは、シトクロームはシトクロームCまたはシトクロームB562である。特に好ましくは、シトクロームは、1分子中にPQQとヘムの両方を有する蛋白質であるキノヘモ蛋白質に由来するものである。また好ましくは、シトクロームは、キノヘモ蛋白質アルコール脱水素酵素に由来するものである。特に好ましくは、シトクロームは、*Comamonas*
15 *testosteroni* のキノヘモ蛋白質エタノールデヒドロゲナーゼの電子伝達ドメインに由来するものである。

また好ましくは、本発明の融合蛋白質は、以下の（a）または（b）：

（a）配列番号2に記載されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（b）アミノ酸配列（a）において1もしくはそれ以上のアミノ酸配列が欠失、
20 置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース脱水素酵素活性および電子伝達機能を有する蛋白質
のいずれかである。

別の観点においては、本発明は、本発明の融合蛋白質をコードする遺伝子、この遺伝子を含むベクターならびに形質転換体を提供する。好ましくは、融合蛋白質
25 をコードする遺伝子は形質転換体の主染色体に組み込まれている。

さらに別の観点においては、本発明は、本発明の融合蛋白質が装着されている酵素電極、ならびにこのような酵素電極を用いることを特徴とするグルコースセンサーを提供する。

本発明はまた、試料中のグルコース濃度を測定する方法であって、

試料を上述の酵素電極と接触させ、そして
グルコースの酸化に伴って発生する電子を測定する、
ことを含む方法を提供する。

- 本発明の融合蛋白質を用いることにより、電子メディエータを必要としない直
5 接電子伝達型のグルコースセンサーを製造することが可能となる。

図面の簡単な説明

図1は、融合蛋白質の構造の例を示す。

図2は、図1に示す融合蛋白質をコードする遺伝子の配列を示す。

- 10 図3は、電子受容体存在下における本発明のグルコースセンサーによるグルコース濃度の測定の結果を示す。

図4は、電子受容体非存在下における本発明のグルコースセンサーの応答電流を示す。

- 15 図5は、電子受容体非存在下における本発明のグルコースセンサーによるグルコース濃度の測定の結果を示す。

図6は、フロー型グルコースセンサーのフローセル部分の構造の一例を示す。

図7は、本発明の融合蛋白質を利用したフローセル型グルコースセンサーの応答電流を示す。

- 20 図8は、本発明の融合蛋白質を利用したフローセル型グルコースセンサーの連続運転の結果を示す。

発明の詳細な説明

融合蛋白質の構造

- 25 本発明の融合蛋白質は、PQQGDHとシトクロームとが連結された構造を有しており、必要に応じてこれらの間にリンカー部分が存在していてもよい。

PQQGDHとは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、

種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性PQQGDHは *Acinetobacter calcoaceticus* のいくつかの株においてその存在が確認されており (Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59(8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている (Mol. Gen. Genet. (1989), 217: 430-436)。本発明においては、これらのいずれのPQQGDHも用いることができる。

さらに、PQQGDHにおいては、アミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。特定の領域のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、グルコースを酸化する酵素活性を維持したまま、酵素の熱安定性や基質に対する親和性を改良しうることが明らかにされている (例えば、特開 2000-350588、特開 2001-197888、特開 2000-312588 を参照)。本発明の融合蛋白質においては、これらの改変されたPQQGDHを用いてもよい。

シトクロームとは、電子伝達体としての機能を有するヘム蛋白質をいう。とりわけ、蛋白質分子にヘム鉄が一つあるいは複数、共有結合あるいは非共有結合的に結合している蛋白質分子である。種々の生物から、シトクロームb、シトクロームc等の多くの種類のシトクロームが単離同定されており、これらのいずれも本発明において用いることができる。例としては、*E. coli* B株 (Eur. J. Biochem. 202 (2), 309-313 (1991))、*E. coli* K株 (Tower, M.K., Biochem. Biophys. Acta. 1143, 109-111 (1993)) *Acinetobacter calcoaceticus*、*Klebsiella pneumoniae*、*S. typhi*、*S. typhimurium*、*K. pneumoniae*、*Y. pestis*、*P. multocida*、*S. pneumoniae*等の細菌に由来するシトクロームb 562が挙げられる。また、これらのシトクロームから作製されるキメラ蛋白質を用いてもよい。

さらに、電子移動サブユニットまたはヘム含有ドメインを有する酸化還元酵素が知られており、これらの酵素のヘム蛋白質サブユニットまたはヘム蛋白質ドメインも、本発明におけるシトクロームに含まれる。特に、PQQを補酵素とする蛋白質のうち、蛋白質分子中にPQQ以外にヘム鉄を結合しているシトクロームを有するキノヘモ蛋白質のシトクロームドメインも含まれる。さらにキノヘモ蛋白質のうち、アルコール脱水素酵素活性を有するキノヘモアルコール脱水素酵素

のシトクロームドメインも含まれる。またそのような酸化還元酵素の例としては、エタノールデヒドロゲナーゼおよびオリゴサッカライドデヒドロゲナーゼなどが挙げられる。

特に好ましくは、*Comamonas testosteroni* のキノヘムエタノールデヒドロゲナーゼ (QHEDH) のシトクローム c ドメインを用いることができる。最近 QHEDH の 3 D 構造が明らかにされた (J. Biol. Chem., 277, 2002, 3727-3732)。QHEDH は 2 つの異なるドメインから構成される。第 1 ドメインは PQQ 含有触媒ドメインであり、PQQGDH と類似する 8 枚羽根の β プロペラ構造から構成される。C 末端領域に位置する第 2 ドメインはシトクローム c ドメインである。これらのドメインは、ペプチドリッカー領域により分離されている。QHEDH においては、酸化還元中心である PQQ から電子受容体であるシトクローム c を介して、呼吸鎖に電子が伝達される。

また、本発明において用いられるシトクロームは、天然のシトクロームの構造の一部が改変されている改変型シトクロームであってもよい。このような改変型シトクロームは、例えば、天然に生ずるシトクロームの 1 またはそれ以上のアミノ酸残基を他の天然のまたは天然に存在しないアミノ酸残基で置換することにより、あるいは 1 またはそれ以上のアミノ酸を欠失させるかまたは付加することにより製造することができる。

リンカー部分とは、融合蛋白質中で PQQGDH とシトクロームとを連結する部分である。リンカー部分は、PQQGDH とシトクロームとを、GDH 活性が発揮されかつ PQQ からシトクロームへの電子の効率的な伝達が可能となるように配置させる機能を有する。リンカー部分の配列としては、天然または合成の任意のアミノ酸配列を用いることができる。例えば、PQQGDH またはシトクロームに由来する適当な配列であってもよく、融合蛋白質をコードする遺伝子を構築するために用いたベクターに由来する配列であってもよい。

融合蛋白質の製造方法

本発明の融合蛋白質は、PQQGDH をコードする遺伝子配列とシトクロームをコードする遺伝子配列とを、必要に応じてリンカー部分を介して、インフレー

ムとなるよう連結させて、これを組換え的に発現させることにより製造することができる。図1は、本発明の融合蛋白質の一例を、図2はこの融合蛋白質をコードする遺伝子の配列を示す。図中、5'側から3'側に、PQQGDHをコードする配列、リンカー部分、およびシトクロームをコードする配列が連結されている。Acinetobacter calcoaceticus 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は、Mol.Gen.Genet.(1989),217:430-436に開示されており、Comamonas testosteroni のキノヘムエタノールデヒドロゲナーゼ(QHEDH)をコードする遺伝子の配列は、J. Biol. Chem., 277, 2002, 3727-3732に開示されている。これらの配列を基に、遺伝子操作により融合蛋白質をコードする遺伝子を構築することができる。遺伝子操作のための種々の方法は、当該技術分野においてよく知られている。

このようにして得た融合蛋白質をコードする遺伝子を、遺伝子発現用のベクター(例えばプラスミド)に挿入し、これを適当な宿主(例えば大腸菌)に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

融合蛋白質を発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎する。これを超遠心分離し、融合蛋白質を含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現した融合蛋白質を培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の融合蛋白質を調製する。

25 酵素電極

本発明はまた、本発明にしたがう融合蛋白質が固定化された酵素電極を特徴とする。酵素電極とは、金電極、白金電極、カーボン電極等の電極表面上に酵素が固定化されている電極である。酵素電極は、酵素の反応特異性を利用して、種々の生理活性物質を特異的に検出するバイオセンサーとして広く用いられている。

本発明の融合蛋白質は、酵素電極において被検物質（例えばグルコース）の存在を認識し、その酸化還元反応を触媒し、その結果生じる電子を電極に伝達するよう作用する。

酵素電極を作製するためには、電極上に本発明の融合蛋白質を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどのポリマー中に固定する方法などがあり、これらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の融合蛋白質をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

グルコースセンサー

別の観点においては、本発明は、作用極として上述の本発明の酵素電極を用いることを特徴とするセンサーを提供する。本明細書において用いる場合、センサーとは、目的とする被検物質の濃度を電気化学的に測定する測定系をいい、通常は、作用極（酵素電極）、対極（白金等）、および参照極（Ag/AgCl 等）の3電極を含む。あるいは、慣用の簡易血糖値システムにおいて用いられているような、作用極と対極とから構成される2電極系でもよい。センサーはさらに、緩衝液および被検試料を入れる恒温セル、作用極に電圧を印加する電源、電流計、記録計等を含む。センサーは、バッチ型であってもフロー型であってもよい。特にフロー型のセンサーとしては、血糖値を連続で計測できるセンサーであってもよい。すなわち、連続的に供給される血液試料、あるいは同透析試料、あるいは血液中あるいは細胞間質液中に本発明の酵素を固定した二電極系あるいは三電極系を挿入して計測するセンサーであってもよい。このような酵素センサーの構造は、当該技術分野においてよく知られており、例えば Biosensors -Fundamental and Applications-Anthony P. F. Turner, Isao Karube and Geroge S. Wilson, Oxford University Press 1987 に記載されている。

本発明の1つの好ましいフロー型センサーのフローセル部分の概略を図6に示す。フローセル1には所定の流速でサンプルを流すための流路が設けられており、

適当な緩衝液で希釈した被検物質はサンプル入口 20 からセルに入り、サンプル出口 22 から出てサンプルドレインに導かれる。フローセル 1 には作用極 10、対極 12、および参照極 14 が装着されており、作用極 10 として本発明の酵素電極を用いる。作用極 10 にはポテンシオスタット（図示せず）により一定の電圧が印加されている。図 6 では 2 本の作用極を用いているが、作用極は 1 本でもよい。

グルコースのアッセイ

本発明のグルコースセンサーを用いるグルコースの濃度の測定は、以下のよう
10 にして行うことができる。センサーの恒温セルに緩衝液を入れ、一定温度に維持する。作用電極として本発明の融合蛋白質を固定化した酵素電極を用い、対極としては例えば白金電極を、参照電極としては例えば Ag / AgCl 電極を用いる。作用極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、恒温セルにグルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作
15 製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願 2003-340092 号の明細書および図面に
20 記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

実施例

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

25

発現ベクターの構築

PQQGDH の構造遺伝子（停止コドンを含まない）および QHEDH の電子伝達ドメインは、5' 末端に制限酵素認識部位を有するプライマーを用いて、それぞれ *A. calcoaceticus* LMD79.41、および *C. testosteroni* ATCC15667 のゲノム

からPCR法により増幅した。用いたプライマーは以下のとおりである：

g d h B ; センス

5'-GGCCATGGATAAACATTTATTGGCTAAAATTGCTTTAT-3' (配列番号 3)

アンチセンス

5 5'-GGGGGAGCTCCTTAGCCTTATAGGTGAAC-3' (配列番号 4)

q h e d h c y t c ドメイン ; センス

5'-GGGGGAGCTCGGCAAGGCCAGGATGCCGGA-3' (配列番号 5)

アンチセンス

5'-GGGGAAGCTTTCAGGGCTTGGGCCGGATGG-3' (配列番号 6)

- 10 これらのPCR産物を発現ベクター p T r c 9 9 A (Amersham Biosciences, Sweden) のマルチクローニングサイトに挿入して、発現ベクター p G B E T を調製した。このようにして、P Q Q G D H の C 末端側にリンカー領域を介して Q H E D H のシトクローム c ドメインが連結された融合遺伝子を構築した (図 2)。
- 15 P Q Q G D H をコードする配列は大文字で、シトクロームをコードする配列は小文字で示されており、制限酵素認識部位には二重下線が、リンカー領域には下線が施されている。P Q Q G D H とシトクローム c ドメインとの間のリンカー領域は、Q H E D H の天然の構造に由来する 2 4 アミノ酸残基から構成される。

- ヘム含有シトクローム c を E. c o l i 中で発現させるためには、c c m 遺伝子の発現が必須であるため、Km プロモータの制御下にシトクローム c の成熟に必要な c c m 遺伝子を有するプラスミド p E C 8 6 (Professor Linda Toeny-Meyer, ETH Switzerland より贈与) を用いて、c c m が構成的に発現されるようにした。
- 20

- p G B E T を p E C 8 6 とともに E. c o l i D H 5 α を形質転換した。融合蛋白質発現ベクターと c c m 発現ベクターの両方を有する形質転換体はピンク色を呈し、成熟シトクローム c が細胞内で産生されていることが示唆された。
- 25

融合蛋白質の発現および精製

形質転換体を M M I 培地で半好気条件下で 3 0 $^{\circ}$ C で 1 0 時間培養し、菌体を回収して、1 0 mM リン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 0) に再懸濁した。これをフ

レンチプレスで破壊し（110 MPa）、超遠心分離（160, 500×g, 1.5 h, 4℃）し、上清を10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で透析した。得られた上清を10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化したResource Sカチオン交換カラム（Amersham Biosciences）に負荷し、5-150 mM NaCl / 10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）の勾配を用いて酵素を溶出した。

精製酵素はSDS-PAGEで約65 kDaに1本のバンドを示し、これは融合蛋白質について予測された分子量と一致した。さらにこのバンドは、ヘム染色により染色された。

10 精製融合蛋白質のUV/Visスペクトルは、波長411 nmの酸化型シトクロームcのピークを示した。還元剤であるヒドロ亜硫酸ナトリウムを加えると、融合蛋白質が還元されて、還元型シトクロームcに典型的な416 nm, 522 nmおよび551 nmのピークを示した。このことから、融合蛋白質はヘムを有しており、シトクロームcとして機能することが確認された。

15 次に、PQQとシトクロームcドメインとの間の分子内電子伝達を調べるために、酸化型の融合蛋白質にグルコースを加えた。電子受容体非存在下でグルコース20 mMを添加すると、時間とともにシトクロームcのスペクトルが酸化型から還元型に変化した。この結果は、融合蛋白質がGDH活性を有しており、かつ、グルコースの酸化に伴って酸化還元中心であるPQQからシトクロームcに分子内電子移動が生じたことを示す。

酵素活性の測定

酵素活性の測定は10 mM MOPS-NaOH緩衝液（pH 7.0）中において0.06 mM DCIPおよび0.6 mM PMSを用いて行った。1分間に1 μmolのグルコースを酸化する酵素の活性を1ユニットと定義した。表1に精製酵素の動力学的パラメータを示す。

| | Km(mM) | Vmax(U/mg) | Vmax/Km |
|-------|--------|------------|---------|
| グルコース | 23 | 3057 | 133 |
| マルトース | 15 | 1721 | 114 |
| ラクトース | 19 | 1584 | 82 |

本発明の融合蛋白質は約 3 0 0 0 U/mg 蛋白質の GDH 活性を有しており、これは野生型 P Q Q G D H の活性の約 7 0 % に相当する。また、融合蛋白質のグルコースに対する Km 値および基質特異性は、野生型 (Biocatal. Biotransform. 20, (2002), 405-412) のものとほとんど同じであった。

電子受容体存在下におけるグルコース濃度の計測

本発明の融合蛋白質 2 5 0 U (約 1 0 0 μ g) あるいは野性型の P Q Q G D H 3 5 0 U を、グラッシーカーボン電極上にグルタルアルデヒド蒸気にさらすことで固定した。1 mM C a C l ₂ を含む 2 0 mM M O P S 緩衝液 (pH 7. 0) に電極を浸し、電子受容体として 1 0 mM のフェリシアン化カリウムを用いて、印加電圧 + 4 0 0 mV (vs Ag/AgCl) にてグルコースに対する応答を測定した。結果を図 3 に示す。図中、「QH-GDH」は本実施例で作製した融合蛋白質を、

「GB WT」は野生型 P P Q G D H を示す。

この条件においては、野性型 P Q Q G D H を固定した電極ではきわめて小さな応答しかみられず、特に、グルコース濃度 0. 2 mM 以上では電子受容体との反応が律速段階となり、応答が飽和した。これに対して、本発明の融合蛋白質を固定した電極では、きわめて大きな応答が得られた。すなわち、野性型酵素固定化電極で飽和したグルコース濃度以上においても、応答のグルコース濃度依存性が見られ、血液中のグルコース濃度である 5 ~ 1 0 mM 以上においても良好な応答を示した。このことから、本発明の融合蛋白質は、電子受容体と組み合わせることにより、野性型酵素が電子受容体と組み合わせた応答よりも高い応答が達成できることが示された。

電子受容体非存在下におけるグルコース濃度の計測

次に、電子受容体の非存在下において、融合蛋白質が電極に電子を伝達する能力を、野生型酵素と電子伝達蛋白質との混合物と比較して調べた。500ユニットのQH-GDHを含有する20mM MOPS緩衝液（pH 7.0）をカーボンペースト（0.5g グラファイト粉末、0.3ml 液体パラフィン、BAS Inc., West Lafayette, USA）とともに混合し、凍結乾燥した。対照としては、野生型PQQGDHと等モルのcytb562またはcytb562と同質量のBSA（牛血清アルブミン）を用いた。次に、凍結乾燥した混合物をカーボンペースト電極の末端に充填した（直径3mm, BAS Inc.）。電極は、使用するまで20mM MOPS緩衝液（pH 7.0）中で4℃で保存した。測定は、1mM CaCl₂を含む20mM MOPS緩衝液（pH 7.0）中で25℃で行った。+300mV vs. Ag/AgClの電圧を印加して、グルコースの添加に伴う電流値の増加を測定した。

本発明の融合蛋白質を固定化した酵素電極は、グルコースの添加に対する迅速な応答を示し、グルコースを添加してから10秒以内にセンシング信号は定常電流に達した（図4）。図中、矢印はグルコースの添加を示す。一方、対照である野生型PQQGDHとcytb562またはBSAを固定化した電極では、電流の増加は観察されなかった。

グルコースアッセイ

種々の濃度のグルコース溶液を用いて、本発明のセンサーのキャリブレーションカーブを求めた（図5）。図中、「QH-GDH」は本実施例で作製した融合蛋白質を、「GBwt」は対照である野生型PQQGDHを表す。観察された電流増加は、最小の検出可能な濃度である0.01mMから5mMまでの濃度範囲で、グルコース濃度に比例していた。さらに、電流応答は酵素量に依存していた。センサーの感度は $9.65 \mu A M^{-1} cm^{-2}$ であった。

グルコースの連続計測

本発明の融合蛋白質を装着した酵素電極を用いてグルコースの連続計測を行っ

た。この実験は、近年注目されている連続計測型血糖計測システムへの本融合酵素の応用を目的として行ったものである。本システムの構成は、連続計測型血糖計測システムの構成に順ずる。

計測は図6に示すフローセルを用いて行った。フローセル1にはサンプルを流す流路が設けられており、適当な緩衝液で希釈した被検物質はサンプル入口20からセルに入り、サンプル出口22から出てサンプルドレインに導かれる。フローセル1には2本の作用極10、対極12、および参照極14が装着されており、ポテンシオスタット（図示せず）により作用極に一定の電圧が印加されている。750Uの融合蛋白質をカーボンペーストと混合し、グルタルアルデヒドにより架橋した後、作用極の表面に固定した。フローセルには1mM CaCl_2 を含む100mMリン酸カリウム緩衝溶液（pH7.0）を連続的に供給した。印加電圧は+300mV vs. Ag/AgCl 、流速は0.5ml/分とした。緩衝溶液に450mg/mlを含むグルコース溶液を一定の混合比で供給することにより、酵素電極が装着されたフローセルへ供給する試料中のグルコース濃度を連続的に変化させ、応答電流を測定した。結果を図7に示す。図示されるように、本発明の融合蛋白質を用いたセンサーにより、センサー内の直接電子移動に基づいて、すなわち電子受容体の添加なしに、グルコース濃度を連続的に計測できることが示された。

次に、この連続グルコース計測システムの長期連続運転について検討した。1mMのグルコースを含む試料を流速0.1ml/分でフローセルに連続的に供給したところ、安定した応答がみられ、72時間後においても初期応答値の70%以上の応答がみられた（図8）。このことから、本発明の融合蛋白質を用いた連続グルコース計測システムは3日間以上、連続的に稼動できることが示された。このような特性は、本融合酵素が、近年注目されている連続計測型血糖計測システムに応用した場合に十分な有効性を有することを示すものである。

産業上の利用性

本発明の融合蛋白質、およびこれを利用した酵素電極ならびにバイオセンサーは、血糖値を測定する直接電子伝達型のグルコースセンサーとして有用である。

請求の範囲

1. ピロロキノリンキノングルコース脱水素酵素 (P Q Q G D H) とシトクロームとの融合蛋白質。
- 5 2. 前記 P Q Q G D H が *Acinetobacter calcoaceticus* 由来の水溶性 P Q Q G D H である、請求項 1 記載の融合蛋白質。
3. 前記シトクロームが、P Q Q G D H の C 末端側に融合されている、請求項 1 または 2 に記載の融合蛋白質。
4. 前記シトクロームが、シトクローム C またはシトクローム B 5 6 2 である、
10 請求項 1 - 3 のいずれかに記載の融合蛋白質。
5. 前記シトクロームが、1 分子中に P Q Q とヘムの両方を有する蛋白質であるキノヘモ蛋白質に由来する、請求項 1 - 4 のいずれかに記載の融合蛋白質。
6. 前記シトクロームが、キノヘモ蛋白質アルコール脱水素酵素に由来する、請求項 1 - 5 のいずれかに記載の融合蛋白質。
- 15 7. 前記シトクロームが、*Comamonas testosteroni* のキノヘモ蛋白質エタノールデヒドロゲナーゼに由来する、請求項 1 - 6 のいずれかに記載の融合蛋白質。
8. 以下の (a) または (b) :
(a) 配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくはそれ以上のアミノ酸配列が欠失、
20 置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース脱水素酵素活性および電子伝達機能を有する蛋白質
のいずれかである、請求項 1 - 7 のいずれかに記載の融合蛋白質。
9. 請求項 1 - 8 のいずれかに記載の融合蛋白質をコードする遺伝子。
10. 請求項 9 に記載の遺伝子を含むベクター。
- 25 11. 請求項 9 に記載の遺伝子を含む形質転換体。
12. 請求項 9 に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている形質転換体。
13. 請求項 1 - 8 のいずれかに記載の融合蛋白質が装着されている酵素電極。
14. 試料中のグルコース濃度を測定する方法であって、
試料を請求項 13 に記載の酵素電極と接触させ、そして

グルコースの酸化に伴って発生する電子を測定する、
ことを含む方法。

15. 作用極として請求項13記載の酵素電極を用いることを特徴とするグル
コースセンサー。

MNKHLLAKIALLSAVQLVTL SAFADVPLTPSQFAKAKSENFDDKKVILSNL
NKPHALLWGPDNQIWLTERATGKILRVNPESGSVKTVFQVPEIVNDADGQ
NGLLGFAFHPDFKNNPYIYISGTFKNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKSTD
TLEKPVDLLAGLPSSKDHQSGRLVIGPDQKIYYTIGDQGRNQLAYLFLPN
QAQHTPTQQELNGKDYHTYMGKVLRLNLDGSIPKDNPSFNGVVSHIYTLG
HRNPQGLAFTPNGKLLQSEQGPNSDDEINLIVKGGNYGWPNAVAGYKDDSG
YAYANYSAANKSIKDLAQNGVKVAAGVPVTKESWTGKNFVPLKTLYT
VQDTYNYNDPTCGEMTYICWPTVAPSSAYVYKGGKAITGWENTLLVPSL
KRGVIFRIKLDPTYSTTYDDAVPMFKSNNRYRDVIASPDGNVLYVLTDTA
GNVQKDDGSVTNTLENPGSLIKFTYKAKELgkarmpefvaqrtgqllqgv
kydpakveagtmlyvancvfchgvpgvdragnipnlgymdasyienlpnf
vfkgpamvrgmpdftgklsgddveslkafiqgtadairpkp

2/8

ATGAATAAAC ATTTATTGGC TAAAATTGCT TTATTAAGCG CTGTTTCAGCT AGTTACACTC
 TCAGCATTTG CTGATGTTCC TCTAACTCCA TCTCAATTTG CTAAAGCGAA ATCAGAGAAC
 TTTGACAAGA AAGTTATTCT ATCTAATCTA AATAAGCCGC ATGCTTTGTT ATGGGGACCA
 GATAATCAAA TTTGGTTAAC TGAGCGAGCA ACAGGTAAGA TTCTAAGAGT TAATCCAGAG
 TCGGGTAGTG TAAAAACAGT TTTTCAGGTA CCAGAGATTG TCAATGATGC TGATGGGCAG
 AATGGTTTAT TAGGTTTTGC CTTCCATCCT GATTTTAAAA ATAATCCTTA TATCTATATT
 TCAGGTACAT TTAAAAATCC GAAATCTACA GATAAAGAAT TACCGAACCA AACGATTATT
 CGTCGTTATA CCTATAATAA ATCAACAGAT ACGCTCGAGA AGCCAGTCGA TTTATTAGCA
 GGATTACCTT CATCAAAAGA CCATCAGTCA GGTCGTCTTG TCATTGGGCC AGATCAAAAG
 ATTTATTATA CGATTGGTGA CCAAGGGCGT AACCAGCTTG CTTATTTGTT CTTGCCAAAT
 CAAGCACAAC ATACGCCAAC TCAACAAGAA CTGAATGGTA AAGACTATCA CACCTATATG
 GGTAAGTAC TACGCTTAAA TCTTGATGGA AGTATTCCAA AGGATAATCC AAGTTTTAAC
 GGGGTGGTTA GCCATATTTA TACACTTGGA CATCGTAATC CGCAGGGCTT AGCATTCACT
 CCAAATGGTA AATTATTGCA GTCTGAACAA GGCCCAAACCT CTGACGATGA AATTAACCTC
 ATTGTCAAAG GTGGCAATTA TGGTTGGCCG AATGTAGCAG GTTATAAAGA TGATAGTGGC
 TATGCTTATG CAAATTATTC AGCAGCAGCC AATAAGTCAA TTAAGGATTT AGCTCAAAAT
 GGAGTAAAAG TAGCCGCAGG GGTCCCTGTG ACGAAAGAAT CTGAATGGAC TGGTAAAAAC
 TTTGTCCCAC CATTAAAAAC TTTATATACC GTTCAAGATA CCTACAATA TAACGATCCA
 ACTTGTGGAG AGATGACCTA CATTTGCTGG CCAACAGTTG CACCGTCATC TGCCTATGTC
 TATAAGGGCG GTAAAAAAGC AATTACTGGT TGGGAAAATA CATTATTGGT TCCATCTTTA
 AAACGTGGTG TCATTTTCCG TATTAAGTTA GATCCAACCT ATAGCACTAC TTATGATGAC
 GCTGTACCGA TGTTTAAGAG CAACAACCGT TATCGTGATG TGATTGCAAG TCCAGATGGG
 AATGTCTTAT ATGTATTAAC TGATACTGCC GGAAATGTCC AAAAAGATGA TGGCTCAGTA
 ACAAATACAT TAGAAAACCC AGGATCTCTC ATTAAGTTCA CCTATAAGGC TAAGGAGCTC
ggcaaggcca ggatgccgga gttcgtggcc cagcgcaccg gccagttgct gcagggcgtg
aaatacgacc ccgccaaagt cgaggccggc accatgctgt atgtggccaa ctgcgttttc
tgtcacggcg tgcttgccgt ggaccgtggc ggaaacattc ccaatctggg ttacatggac
gcgagctata tcgagaacct gccaaacttt gtcttcaagg gcccgcccat ggtgcgcggc
atgccggact tcacgggcaa gttgctcggc gatgacgtgg agtcacctca ggccttcac
cagggcacgg cggacgccat ccggcccaag ccctga

3/8

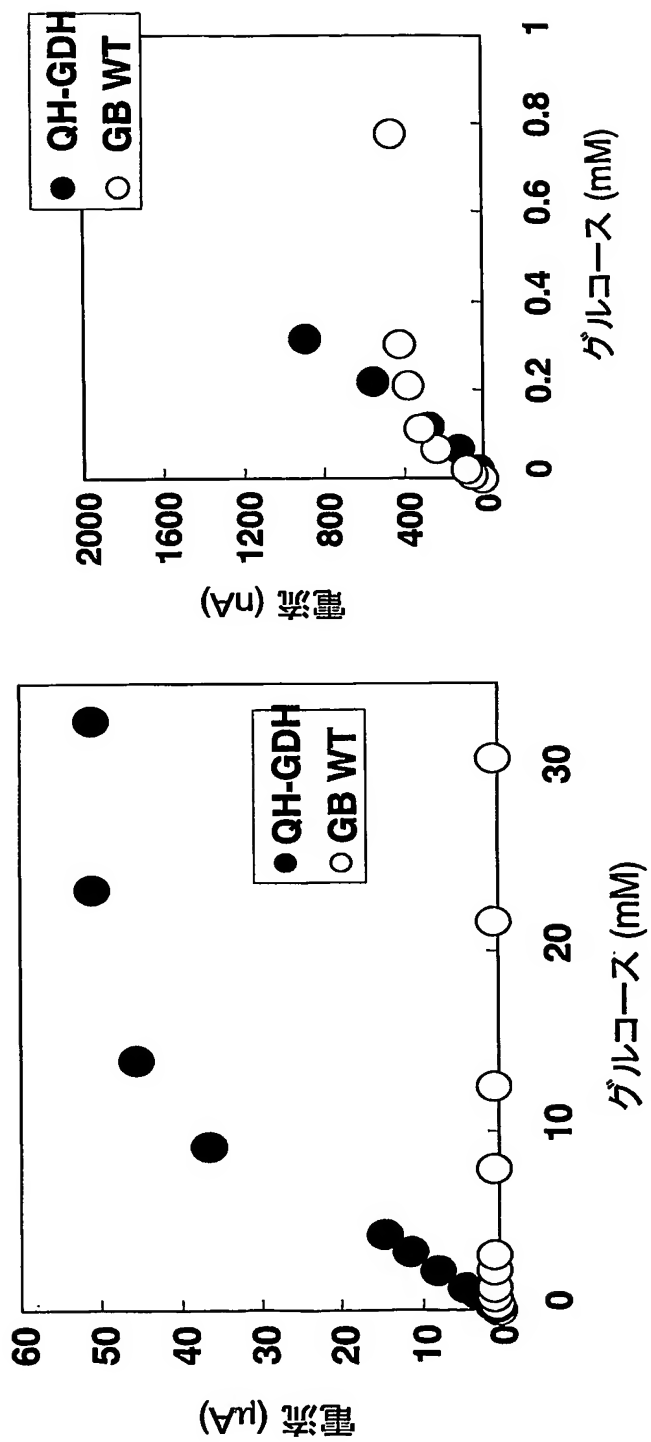


図3

4/8

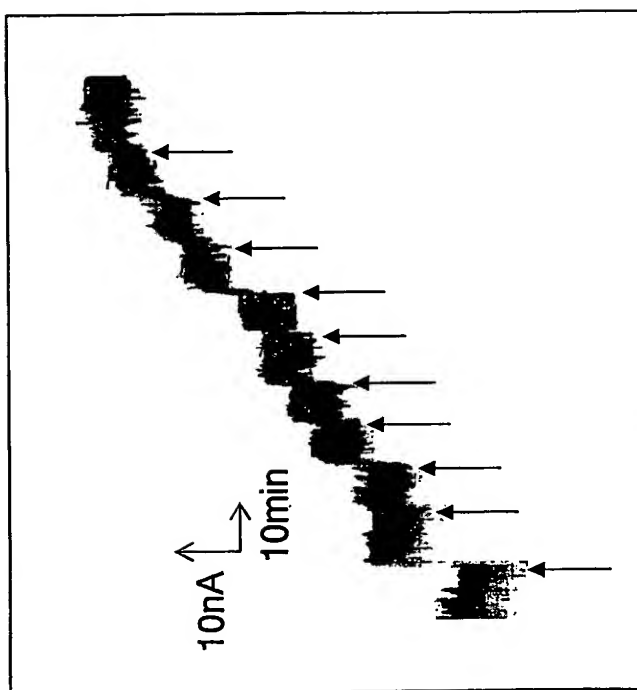


図4

5/8

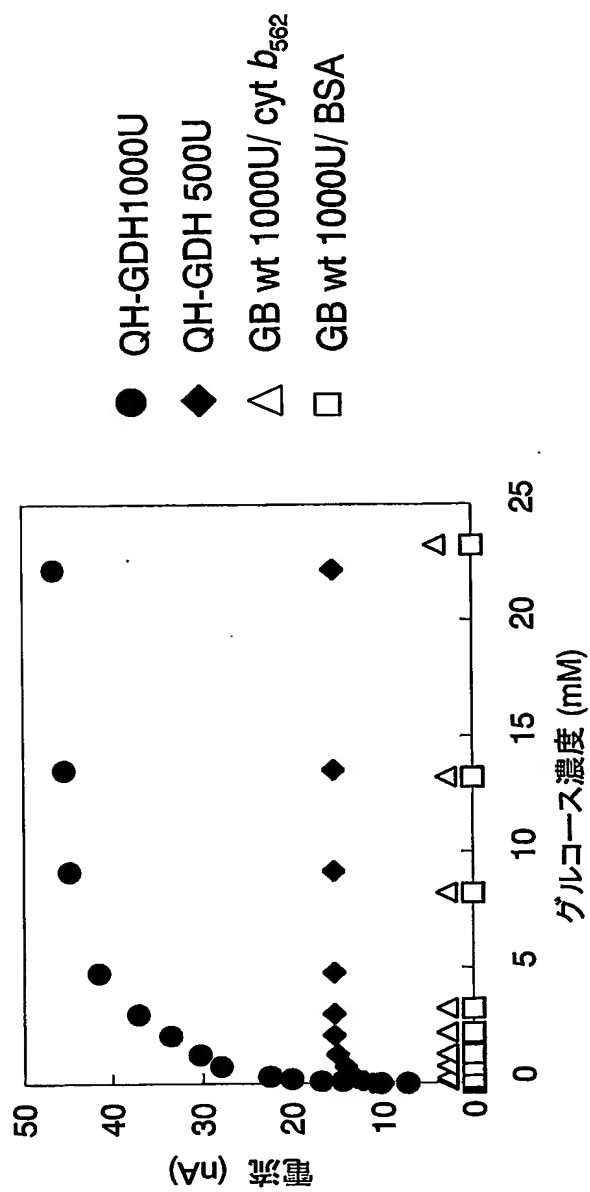


図5

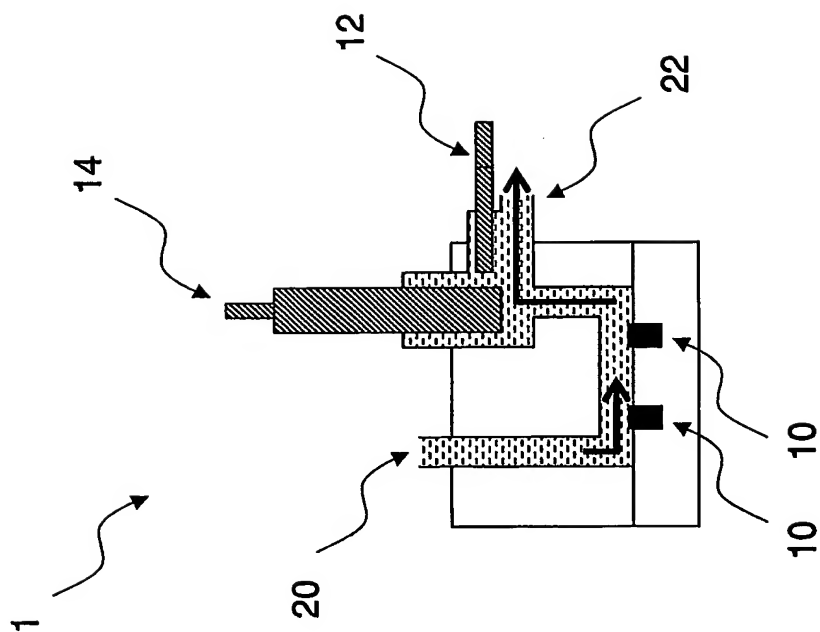


図6

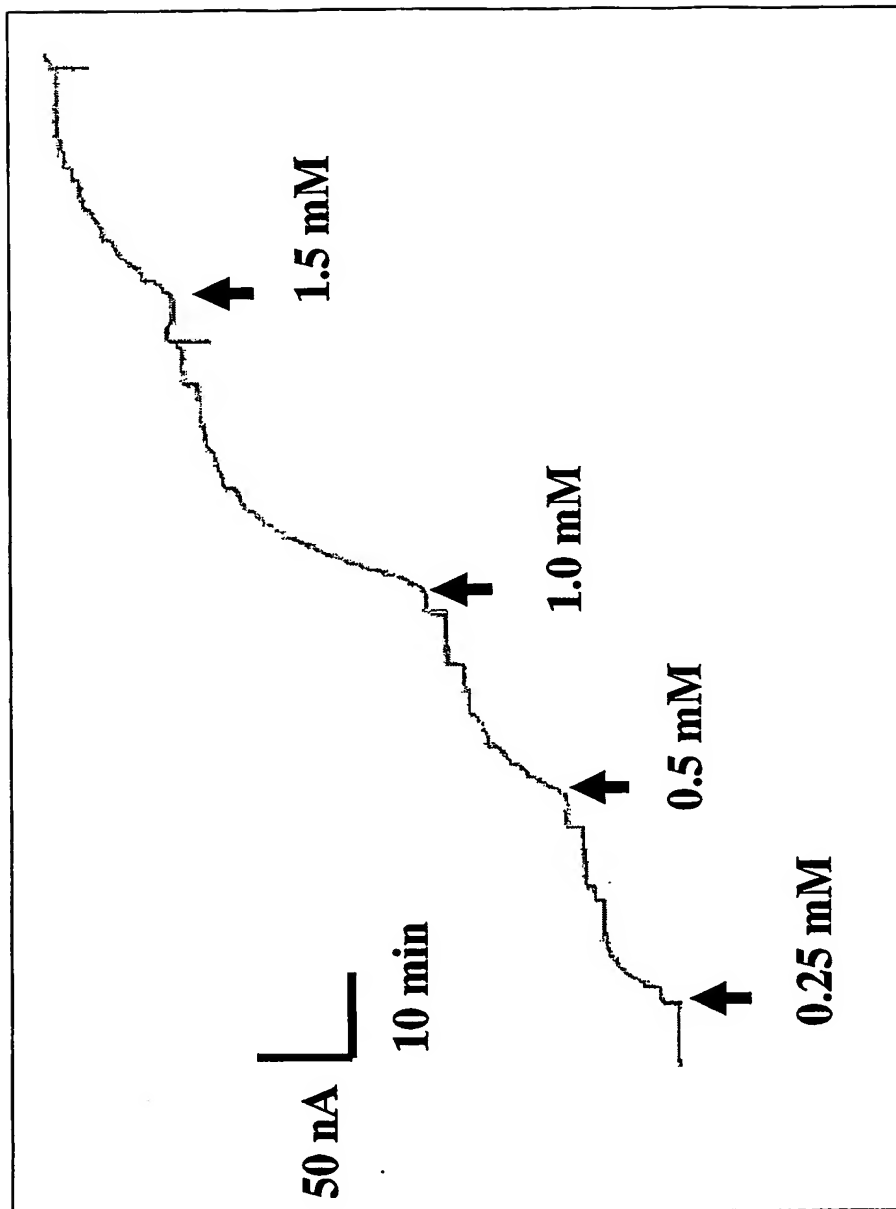


図7

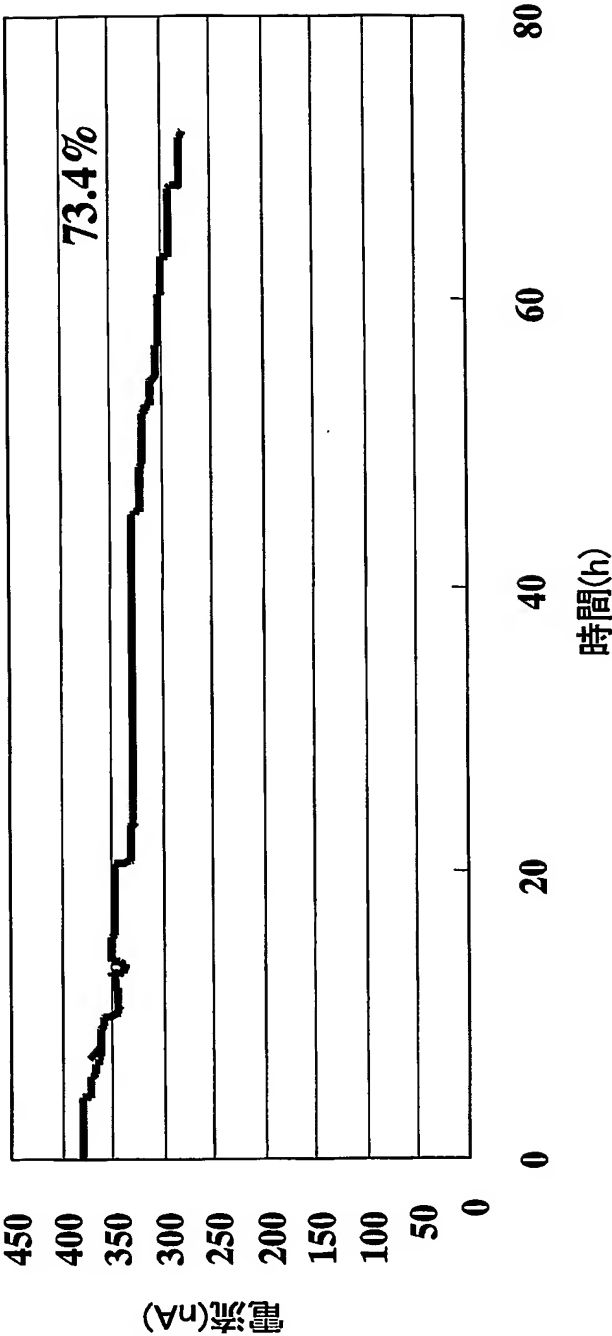


図8

SEQUENCE LISTING

<110> Sode, Koji
 <120> Glucose Dehydrogenase
 <130> PSD-9014WO
 <150> JP 2003-340092
 <151> 2003-09-30
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1776
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> DNA coding for fusion protein
 <400> 1

| | |
|---|------|
| atgaataaac atttattggc taaaattgct ttattaagcg ctgttcagct agttacactc | 60 |
| tcagcatttg ctgatgttcc tctaactcca tctcaatttg ctaaagcgaa atcagagaac | 120 |
| tttgacaaga aagttattct atctaatacta aataagccgc atgctttgtt atggggacca | 180 |
| gataatcaaa tttggttaac tgagcgagca acaggtaaga ttctaagagt taatccagag | 240 |
| tcgggtagtg taaaaacagt ttttcaggta ccagagattg tcaatgatgc tgatgggcag | 300 |
| aatggtttat taggttttgc cttccatcct gatttttaaaa ataatcctta tatctatatt | 360 |
| tcagggtacat ttaaaaaatcc gaaatctaca gataaagaat taccgaacca aacgattatt | 420 |
| cgtcgttata cctataataa atcaacagat acgctcgaga agccagtcga tttattagca | 480 |
| ggattacott catcaaaaaga ccatcagtcg ggtogtcttg tcattggggc agatcaaaag | 540 |
| atattattata cgattggtga ccaagggcgt aaccagcttg cttattttgtt cttgccaaat | 600 |
| caagcacaaac atacgccaac tcaacaagaa ctgaatggta aagactatca cacctatatg | 660 |
| ggtaaagtac tacgcttaaa tcttgatgga agtattccaa aggataatcc aagttttaac | 720 |
| ggggtgggta gccatattta tacacttgga catcgtaatc cgcagggctt agcattcact | 780 |
| ccaaatggta aattattgca gtctgaacaa ggcccaaact ctgacgatga aattaacctc | 840 |
| attgtcaaag gtggcaatta tgggtggccg aatgtagcag gttataaaga tgatagtggc | 900 |
| tatgcttatg caaattattc agcagcagcc aataagtcaa ttaaggattt agctcaaaat | 960 |
| ggagtaaaag tagccgcagg ggtccctgtg acgaaagaat ctgaatggac tggtaaaaac | 1020 |
| tttgtccac cattaaaaac tttatatacc gttcaagata cctacaacta taacgatcca | 1080 |
| acttgtggag agatgacctt catttgctgg ccaacagttg caccgtcatc tgccatgtc | 1140 |
| tataagggcg gtaaaaaagc aattactggg tgggaaaata cattattggg tccatcttta | 1200 |
| aaacgtgggtg tcattttccg tattaagtta gatccaactt atagcaactac ttatgatgac | 1260 |

2/5

gctgtaccga tgtttaagag caacaaccgt tatcgtgatg tgattgcaag tccagatggg 1320
 aatgtottat atgtattaac tgatactgcc ggaaatgtcc aaaaagatga tggctcagta 1380
 acaaatacat tagaaaaccc aggatctctc attaatgtca cctataaggc taaggagctc 1440
 ggcaaggcca ggatgccgga gttcgtggcc cagcgcaccg gccagttgct gcagggcgtg 1500
 aaatacgacc ccgccaaggt cgaggccggc accatgctgt atgtggccaa ctgcgttttc 1560
 tgtcacggcg tgcctggcgt ggaccgtggc ggaaacattc ccaatctggg ttacatggac 1620
 gcgagctata tcgagaacct gccaaacttt gtcttcaagg gcccgcccat ggtgcgcggc 1680
 atgccggact tcacgggcaa gttgtcgggc gatgacgtgg agtccctcaa ggccttcac 1740
 cagggcacgg cggacgccat ccggcccaag ccctga 1776

<210> 2

<211> 591

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> fusion protein

<400> 2

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Ala Leu Leu Ser Ala Val Gln

1 5 10 15

Leu Val Thr Leu Ser Ala Phe Ala Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln

20 25 30

Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser

35 40 45

Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile

50 55 60

Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu

65 70 75 80

Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp

85 90 95

Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe

100 105 110

Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys

115 120 125

Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr

130 135 140

Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala

145 150 155 160

3/5

Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly
 165 170 175
 Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln
 180 185 190
 Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln
 195 200 205
 Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu
 210 215 220
 Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn
 225 230 235 240
 Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly
 245 250 255
 Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro
 260 265 270
 Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly
 275 280 285
 Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala
 290 295 300
 Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn
 305 310 315 320
 Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp
 325 330 335
 Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln
 340 345 350
 Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile
 355 360 365
 Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly
 370 375 380
 Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu
 385 390 395 400
 Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr
 405 410 415
 Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg
 420 425 430
 Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp
 435 440 445

4/5

Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu

450

455

460

Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Lys Ala Lys Glu Leu

465

470

475

480

Gly Lys Ala Arg Met Pro Glu Phe Val Ala Gln Arg Thr Gly Gln Leu

485

490

495

Leu Gln Gly Val Lys Tyr Asp Pro Ala Lys Val Glu Ala Gly Thr Met

500

505

510

Leu Tyr Val Ala Asn Cys Val Phe Cys His Gly Val Pro Gly Val Asp

515

520

525

Arg Gly Gly Asn Ile Pro Asn Leu Gly Tyr Met Asp Ala Ser Tyr Ile

530

535

540

Glu Asn Leu Pro Asn Phe Val Phe Lys Gly Pro Ala Met Val Arg Gly

545

550

555

560

Met Pro Asp Phe Thr Gly Lys Leu Ser Gly Asp Asp Val Glu Ser Leu

565

570

575

Lys Ala Phe Ile Gln Gly Thr Ala Asp Ala Ile Arg Pro Lys Pro

580

585

590

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

ggccatggat aaacatttat tggctaaaat tgctttat

38

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

gggggagctc cttagcctta taggtgaac

29

<210> 5

<211> 30

5/5

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

gggggagctc ggcaaggcca ggatgccgga

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

ggggaagctt tcaggccttg ggccggatgg

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K19/00, C07K14/80, C12N15/62, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N9/04, C12Q1/02, C12Q1/54, C12M1/40, G01N27/30, G01N27/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K19/00, C07K14/80, C12N15/62, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N9/04, C12Q1/02, C12Q1/54, C12M1/40, G01N27/30, G01N27/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | WO 02/073181 A1 (Koji HAYADE), 19 September, 2002 (19.09.02), Full text (Family: none) | 1-15 |
| Y | JP 2002-125689 A (Koji HAYADE), 08 May, 2002 (08.05.02), Full text (Family: none) | 1-15 |
| Y | Oubrie A. et al., Crystal structure of quinoxemoprotein alcohol dehydrogenase from Comamonas testosteroni: structural basis for substrate oxidation and electron transfer, J.Biol.Chem., 2002, Vol.277, No.5, pages 3727-32 | 1-15 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 November, 2004 (10.11.04)

Date of mailing of the international search report
30 November, 2004 (30.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014575

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P,X | OKUDA J. et al., PQQ glucose dehydrogenase with novel electron transfer ability, Biochem.Biophys.Res.Comm., 2004 February, Vol.314, No.3, pages 793-7 | 1-15 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C07K19/00, C07K14/80, C12N15/62, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N9/04, C12Q1/02, C12Q1/54, C12M1/40, G01N27/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C07K19/00, C07K14/80, C12N15/62, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N9/04, C12Q1/02, C12Q1/54, C12M1/40, G01N27/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JOIS) BIOSIS/WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y | WO 02/073181 A1 (早出広司) 2002.09.19, 全文 (ファミリーなし) | 1-15 |
| Y | JP 2002-125689 A (早出広司) 2002.05.08, 全文 (ファミリーなし) | 1-15 |
| Y | Oubrie A. et al., Crystal structure of quinoxemoprotein alcohol dehydrogenase from Comamonas testosteroni: structural basis for substrate oxidation and electron transf er, J. Biol. Chem., 2002, Vol.277, No.5, pages 3727-32 | 1-15 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.11.2004

国際調査報告の発送日

30.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| P X | Okuda J. et al., PQQ glucose dehydrogenase with novel electron transfer ability, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004 Feb, Vol.314, No.3, pages 793-7 | 1-15 |